

明細書

ケモカイン受容体 CCR4 に対する遺伝子組換え抗体を含む医薬

技術分野

本発明は、ヒト CC ケモカイン受容体 4 (CCR4) に特異的に結合する遺伝子組換え抗体または該抗体断片と、少なくとも 1 種類の薬剤とを組み合わせるなる医薬に関する。

背景技術

ケモカイン受容体にリガンドが結合すると、白血球の遊走が誘導される。正常組織において主として Th2 型の CD4 陽性ヘルパー T 細胞上に発現しているヒト CC ケモカイン受容体 4 (以下 CCR4 と称する) はケモカイン受容体ファミリーの一種である [Int. Immunol., 11, 81 (1999)]。CCR4 はリガンドである TARC (thymus and activation-regulated chemokine) または MDC (macrophage-derived chemokine) と特異的に結合する。Th2 型の CD4 陽性ヘルパー T 細胞は液性免疫における制御細胞であり、アレルギーや自己免疫疾患において重要な役割を果たしていると考えられている。

T 細胞系統の白血病/リンパ腫細胞では、種々のケモカイン受容体が発現しており、T 細胞白血病/リンパ腫のサブタイプと細胞で発現される受容体の種類との間には関連がある。白血病/リンパ腫細胞において CCR4 は高い頻度で発現していることが報告された [Blood, 96, 685 (2000)]。CCR4 は ALK-陽性異型性大細胞リンパ腫 (ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma)、菌状糸肉症細胞 (mycosis fungoides) で高頻度で発現しているため、特定の癌種においては非常に選択性の高い腫瘍マーカーとなりうる可能性が示唆された [Blood, 96, 685 (2000)、Mod. Pathol., 15, 838 (2002)、J. Invest. Dermatol., 119, 1405 (2002)]。またヒト T 細胞性白血病ウイルス 1 型 (human T-cell leukemia virus type 1) の感染が原因である成人 T 細胞性白血病 (以下 ATL と称す; adult T-cell leukemia) でも、CCR4 が非常に高い頻度で発現していることが報告された [Blood, 99, 1505 (2002)]。また、ATL における CCR4 発現に関しては、CCR4 の発現は予後不良と有意に相関する [Clin. Cancer Res., 9, 3625 (2003)]。さらに慢性 T 細胞性白血病 (以下 CTL と称す; cutaneous T cell lymphoma) の細胞でも CCR4 は選択的に発現している [J. Invest. Dermatol., 119, 1405 (2002)]。

白血病/リンパ腫に対する主な治療法は、複数の低分子抗癌剤の組み合わせを中心とした化学療法である。しかしながら、これまでに十分な治療効果が得られる化学療法は知られていない [癌と化学療法、26, Supplement I, 165-172, (1999)]。

上記の CCR4 陽性の白血病/リンパ腫の中でも、特に ATL の予後が不良である。通常行われている CHOP 療法 (cyclophosphamide、vincristine、doxorubicin、prednisone の併用療法) を行なった ATL 全体の 7 割以上を占める急性型あるいはリンパ腫型患者のうち、4 年生存率は 5% 程度である [British J. Haematol., 79, 428-437 (1991)]。

通常の化学療法では、薬剤耐性腫瘍細胞の出現などにより寛解を導入することが難しい場合があるが、化学療法と抗体との併用により優れた治療成績が得られる場合がある。抗 HER2/neu ヒト化抗体 rhuMAb HER2 (Herceptin/trastuzumab、Roche 社) は taxane 系抗癌剤との併用療法により乳癌に対して顕著な効果を示した [Clinical Therapeutics, 21, 309 (1999)]。また、抗 CD20 ヒト型キメラ抗体 IDEC-C2B8 (Rituxan/rituximab、IDEC 社) は多剤療法との併用療法により B 細胞リンパ腫に対して顕著な効果を示した [J. Clin. Oncol., 17, 268 (1999)]。

抗体とサイトカインとを用いる併用療法も腫瘍に対する新たな免疫療法として期待されている。サイトカインは免疫反応における細胞間相互作用を司る種々の液性因子の総称である。細胞障害活性の一つである抗体依存性細胞障害活性（以下 ADCC 活性と称す）は、単核球、マクロファージ、NK 細胞などのエフェクター細胞に抗体が結合することにより引き起こされる [J. Immunol., 138, 1992 (1987)]。サイトカインはエフェクター細胞を活性化する目的で、抗体とサイトカインを組み合わせる併用療法が試みられている。B 細胞系の白血病/リンパ腫に対しては、IDEC-C2B8 とインターロイキン (IL) -2 [British J. Haematol., 117, 828-834 (2002)]、あるいは IDEC-C2B8 と顆粒球コロニー刺激因子 [Leukemia, 17, 1658-1664 (2003)] との併用投与の臨床試験が行われているが、抗体を単独で使った場合と比較して顕著な治療効果は認められていない。

上記の CCR4 陽性の白血病/リンパ腫に対し、抗 CCR4 抗体 KM2760 は、ADCC 活性を介して選択的に腫瘍細胞を減少させる治療薬として知られている (WO03/18635)。これまでに抗 CCR4 抗体と化学療法剤またはサイトカインとの併用については知られていない。

癌、特に白血病・リンパ腫の治療において、十分な効果を奏する治療方法はこれまでに知られていない。

発明の開示

本発明の目的は、CCR4 に対する遺伝子組換え抗体またはその抗体断片と、少なくとも 1 種類の薬剤とを組み合わせる医療を提供することにある。

本発明は以下の (1) ~ (26) に関する。

(1) ヒト CC ケモカイン受容体 4 (CCR4) に特異的に結合する遺伝子組換え抗体または該抗体断片と、少なくとも 1 種類の薬剤とを組み合わせる医療。

(2) CCR4 に特異的に結合する遺伝子組換え抗体または該抗体断片と、少なくとも 1 種類の薬剤とを併用して投与するための医療。

(3) CCR4 に特異的に結合する遺伝子組換え抗体または該抗体断片と、少なくとも 1 種類の薬剤とを同時に又は逐次的に投与するための医療。

(4) 医療が、抗腫瘍剤であることを特徴とする上記 (1) ~ (3) のいずれか 1 項に記載の医療。

(5) 腫瘍が CCR4 を発現している腫瘍である上記 (4) に記載の医療。

(6) CCR4 が発現している腫瘍が造血器腫瘍である上記 (5) に記載の医療。

(7) CCR4 に特異的に結合する遺伝子組換え抗体または該抗体断片が、CCR4 の細胞外領域に特異的に結合し、ヒト血小板に反応性を示さない抗体である上記 (1) ~ (6) のいずれか 1 項に記載の医療。

(8) CCR4 の細胞外領域に特異的に結合する遺伝子組換え抗体または該抗体断片が、CCR4 リガンドである TARC (thymus and activation-regulated chemokine) または MDC (macrophage-derived chemokine) の CCR4 への結合を阻害する活性を有さない上記 (7) に記載の医療。

(9) 細胞外領域が、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の 1~39、98~112、176~206 および 271~284 番目からなる群から選ばれる細胞外領域である上記 (7) または (8) に記載の医療。

(10) 細胞外領域が、配列番号1で示されるアミノ酸配列の2～29番目に存在するエピトープである上記(7)～(9)のいずれか1項に記載の医薬。

(11) 細胞外領域が、配列番号1で示されるアミノ酸配列の13～29番目に存在するエピトープである上記(7)～(10)のいずれか1項に記載の医薬。

(12) 細胞外領域が、配列番号1で示されるアミノ酸配列の13～25番目に存在するエピトープである上記(7)～(11)のいずれか1項に記載の医薬。

(13) CCR4に特異的に結合する遺伝子組換え抗体または該抗体断片が、配列番号1で示されるアミノ酸配列の13～25番目を含むペプチドのうち、16、19、20および22番目の少なくとも1つのチロシン残基が硫酸化されたペプチドへの結合性が配列番号1で示されるアミノ酸配列の13～25番目を含むペプチドへの結合性よりも低いことを特徴とする上記(12)に記載の医薬。

(14) CCR4の細胞外領域に特異的に結合する遺伝子組換え抗体または該抗体断片が、ハイブリドーマKM2160(FERM BP-10090)が生産するモノクローナル抗体が認識するエピトープに特異的に反応する抗体または該抗体断片である、上記(1)～(13)のいずれか1項に記載の医薬。

(15) ヒト型遺伝子組換え抗体がヒト型キメラ抗体またはヒト型CDR移植抗体である上記(1)～(14)のいずれか1項に記載の医薬。

(16) ヒト型キメラ抗体がCCR4に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)および軽鎖(L鎖)V領域の相補性決定領域(CDR)を含む、上記(15)に記載の医薬。

(17) ヒト型キメラ抗体が配列番号5、6、7で表されるアミノ酸配列からなる抗体の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)のCDR1、CDR2、CDR3および/またはそれぞれ配列番号8、9、10で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖(L鎖)V領域のCDR1、CDR2、CDR3を含む上記(15)または(16)に記載の医薬。

(18) ヒト型キメラ抗体が配列番号11で表されるアミノ酸配列からなる抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)および/または配列番号12で表される抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域を含む上記(15)～(17)のいずれか1項に記載の医薬。

(19) ヒト型CDR移植抗体がCCR4に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)および軽鎖(L鎖)V領域の相補性決定領域(CDR)を含む、上記(15)に記載の医薬。

(20) ヒト型CDR移植抗体が配列番号5、6、7で表されるアミノ酸配列からなる抗体の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)のCDR1、CDR2、CDR3および/またはそれぞれ配列番号8、9、10で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖(L鎖)V領域のCDR1、CDR2、CDR3を含む上記(15)または(19)に記載の医薬。

(21) ヒト型CDR移植抗体が配列番号16または17で示されるアミノ酸配列で表されるアミノ酸配列からなる抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)および/または配列番号18で表される抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域を含む、上記(15)、(18)および(20)のいずれか1項に記載の医薬。

(22) 薬剤が、蛋白質または低分子の薬剤である上記(1)～(21)のいずれか1項に記載の医薬。

(23) 蛋白質が、サイトカインまたは抗体である、上記(22)記載の医薬。

(24) サイトカインが、G-CSF、M-CSF、インターフェロン α 、IL-2およびIL-15から選ばれるサイトカインである上記(23)記載の医薬。

(25) 低分子の薬剤が、化学療法剤またはホルモン療法剤である上記(1)～(24)のいずれか1項に記載の医薬。

(26) 化学療法剤が、ビンクリスチン、シクロフォスファミド、エトポシドおよびメトトレキサートから選ばれる薬剤である上記(25)に記載の薬剤。

本発明の医薬の形態としては、CCR4に特異的に反応する遺伝子組換え抗体または該抗体断片と、少なくとも1種類の薬剤とを組み合わせる医薬、CCR4に特異的に反応する遺伝子組換え抗体または該抗体断片と、少なくとも1種類の薬剤とを併用して投与するための医薬、CCR4に特異的に反応する遺伝子組換え抗体または該抗体断片と、少なくとも1種類の薬剤とを同時に又は逐次的に投与するための医薬があげられる。

ここで、組み合わせる医薬とは、CCR4に特異的に結合する遺伝子組換え抗体およびその抗体断片と少なくとも1種類の薬剤とを別々に調製し、これらの薬剤を組み合わせる同時にまたは逐次的に投与する医薬であってもよいし、それぞれの薬剤成分を混合させた合剤であってもよい。それぞれの薬剤成分を混合させた合剤には、CCR4に特異的に結合する遺伝子組換え抗体およびその抗体断片に少なくとも1種類の薬剤を結合させた融合抗体なども包含する。

本発明におけるCCR4に特異的に結合する遺伝子組換え抗体およびその抗体断片(以下、両者を総称して本発明における抗体と表記することもある)としては、ヒトCCR4の細胞外領域に特異的に反応する遺伝子組換え抗体およびその抗体断片があげられるが、ヒト血小板に反応性を示さない遺伝子組換え抗体またはその抗体断片、高いADCC活性を有する遺伝子組換え抗体またはその抗体断片などが好ましい。

ここで抗体がヒト血小板に反応性を示さないとは、抗体がヒト血小板と実質的に反応しないことをいい、具体的には、フローサイトメーターによる測定で反応性を示さないことをいう。

また、本発明における抗体として、好ましくは、配列番号1に示されるアミノ酸配列の1～39、98～112、176～206または271～284番目を含む領域、より好ましくは配列番号1に示されるアミノ酸配列の2～29番目(配列番号2)、さらに好ましくは配列番号1に示されるアミノ酸配列の12～29番目(配列番号3)、特に好ましくは配列番号1に示されるアミノ酸配列の13～25番目(配列番号4)に、特異的に反応する抗体があげられる。また、ハイブリドーマKM2160(FERM BP-10090)が生産するCCR4に結合するモノクローナル抗体が認識するエピトープに特異的に反応する抗体もあげられる。ハイブリドーマKM2160は平成16年8月12日付けで、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6)にFERM BP-10090として寄託されている。

本発明における抗体は、配列番号1で示されるアミノ酸配列の13～25番目を含むペプチドに対する結合性が、配列番号1で示されるアミノ酸配列の13～25番目を含むペプチドのうち、1

6、19、20 および 22 番目の少なくとも 1 以上のチロシン残基が硫酸化されたペプチドに対する結合性が低い抗体が好ましい。

また、本発明における抗体は、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチン耐性を有する細胞 (WO 02/31140、W003/85118、W003/85107) で生産された抗体も包含される。

本発明における遺伝子組換え抗体としては、ヒト化抗体、ヒト抗体等があげられる。

ヒト化抗体としては、ヒト型キメラ抗体及びヒト型 CDR 移植抗体などがあげられる。

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体 H 鎖 V 領域 (以下、HV または VH と称す) および抗体 L 鎖 V 領域 (以下、LV または VL と称す) とヒト抗体の CH およびヒト抗体の L 鎖 C 領域 (以下、CL と称す) とからなる抗体を意味する。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

本発明におけるヒト型キメラ抗体は、CCR4 に特異的に反応するヒト以外の動物のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより、VH および VL をコードする cDNA を取得し、ヒト抗体 CH およびヒト抗体 CL をコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

ヒト型キメラ抗体の CH としては、ヒトイムノグロブリン (以下、hIg と表記する) に属すればいかなるものでもよいが、IgG クラスのものが好適であり、更に IgG クラスに属する $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体の CL としては、 κ クラスあるいは λ クラスのものをを用いることができる。

本発明におけるヒト型キメラ抗体としては、VH の CDR1、CDR2 および CDR3 がそれぞれ配列番号 5、配列番号 6 および配列番号 7、VL の CDR1、CDR2 および CDR3 がそれぞれ配列番号 8、配列番号 9 および配列番号 10 で表されたアミノ酸配列を含むヒト型キメラ抗体、より具体的には VH および VL のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号 11 および配列番号 12 で表されたアミノ酸配列であるヒト型キメラ抗体、さらに具体的には、VH のアミノ酸配列が配列番号 11、H 鎖 C 領域がヒト抗体 IgG1 サブクラスのアミノ酸配列、L 鎖 V 領域が配列番号 12 で表されたアミノ酸配列、L 鎖 C 領域がヒト抗体 κ クラスのアミノ酸配列からなるヒト型キメラ抗体があげられる。例えば W001/64754 に開示された抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体 KM2760 があげられる。

ヒト型 CDR 移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR のアミノ酸配列をヒト抗体の VH および VL の適切な位置に移植した抗体をいう。

本発明におけるヒト型 CDR 移植抗体は、CCR4 に特異的に結合するヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR のアミノ酸配列を任意のヒト抗体の VH および VL の FR に移植した V 領域をコードする cDNA を構築し、ヒト抗体の CH および H 鎖 C 領域 (以下、CL と表記する) をコードする DNA を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

ヒト抗体の VH および VL のフレームワーク (以下、FR と表記する) のアミノ酸配列を選択方法としては、ヒト抗体由来のものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bank などのデータベースに登録されているヒト抗体の VH および VL の FR のアミ

ノ酸配列、またはヒト抗体の VH および VL の FR の各サブグループの共通アミノ酸配列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) などがあげられる。

本発明における抗体の CH としては、ヒトイムノグロブリン (以下、hIg と表記する) に属すればいかなるものでもよいが、IgG クラスのものが好適であり、さらに IgG クラスに属する $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ といったサブクラスの内いずれも用いることができる。また、ヒト型 CDR 移植抗体の CL としては、 κ クラスあるいは λ クラスのものを用いることができる。

本発明におけるヒト型 CDR 移植抗体としては、それぞれ配列番号 5、6、7 で表されるアミノ酸配列からなる抗体 VH の CDR1、CDR2、CDR3 および／またはそれぞれ配列番号 8、9、10 で表されるアミノ酸配列からなる VL の CDR1、CDR2、CDR3 を含むヒト型 CDR 移植抗体または該抗体断片などがあげられる。

好ましくは、抗体の VH が配列番号 13 または 14、および／または VL が配列番号 15 で示されるアミノ酸配列を含む、ヒト型 CDR 移植抗体などがあげられる。

より好ましくは、

抗体の VH が、配列番号 13 で示されるアミノ酸配列のうち、40 番目の Ala、42 番目の Gly、43 番目の Lys、44 番目の Gly、76 番目の Lys、および 97 番目の Ala から選ばれる少なくとも 1 つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体、

抗体の VH が、配列番号 14 で示されるアミノ酸配列のうち、28 番目の Thr および 97 番目の Ala のうち少なくとも 1 つ以上のアミノ酸残基が置換されたアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体、

抗体の VL が、配列番号 15 で示されるアミノ酸配列のうち、2 番目の Ile、3 番目の Val、50 番目の Gln、および 88 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つ以上のアミノ酸残基が置換されたアミノ酸配列を含む、ヒト型 CDR 移植抗体、

抗体の VH が、配列番号 13 で示されるアミノ酸配列のうち、40 番目の Ala、42 番目の Gly、43 番目の Lys、44 番目の Gly、76 番目の Lys、および 97 番目の Ala、ならびに抗体の VL が、配列番号 15 で示されるアミノ酸配列のうち、2 番目の Ile、3 番目の Val、50 番目の Gln、および 88 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、ヒト型 CDR 移植抗体、

抗体の VH が、配列番号 14 で示されるアミノ酸配列のうち、28 番目の Thr および 97 番目の Ala、ならびに抗体の VL が、配列番号 15 で示されるアミノ酸配列のうち、2 番目の Ile、3 番目の Val、50 番目の Gln、および 88 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、ヒト型 CDR 移植抗体、

さらに好ましくは、抗体の重鎖(H鎖) 可変領域 (V 領域) が、配列番号 16 または 17 で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖(L鎖) V 領域が配列番号 18 で示されるアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体、などがあげられる。

これらのアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、付加、置換または挿入され、かつ CCR4 と特異的に反応する抗体または抗体断片も本発明の範囲に包含される。

本発明におけるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入または付加されたとは、同一配列中の任意かつ1もしくは複数のアミノ酸配列中の位置において、1または複数のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入または付加があることを意味し、欠失、置換、挿入または付加が同時に生じてよく、置換、挿入または付加されるアミノ酸残基は天然型と非天然型とを問わない。天然型アミノ酸残基としては、L-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、L-システインなどがあげられる。

以下に、相互に置換可能なアミノ酸残基の好ましい例を示す。同一群に含まれるアミノ酸残基は相互に置換可能である。

A群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、O-メチルセリン、 ϵ -ブチルグリシン、 ϵ -ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン

B群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸

C群：アスパラギン、グルタミン

D群：リジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸

E群：プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン

F群：セリン、スレオニン、ホモセリン

G群：フェニルアラニン、チロシン

本発明におけるヒト型CDR移植抗体の具体例としては、W003/18635に記載のヒト型CDR移植抗体、W000/42074に記載のモノクローナル抗体1G1、2B10または10E4から作製されるヒト型CDR移植抗体、W099/15666に記載のヒト化抗体またはモノクローナル抗体252Yまたは252Zから作製されるヒト型CDR移植抗体、US6245332に記載のモノクローナル抗体から作製されるヒト型CDR移植抗体などがあげられる。

ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体を意味するが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーおよびヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体なども含まれる。

ヒト体内に天然に存在する抗体は、例えばヒト末梢血リンパ球を単離し、EBウイルスなどを感染させ不死化、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を培養でき、培養物中より、該抗体を精製することができる。

ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒトB細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することにより、Fab、scFvなどの抗体断片をファージ表面に発現させたライブラリーである。該ライブラリーはレパートリーを増やすために、人為的に変異を導入したライブラリーを用いることもできる。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有するファージを回収できる。該抗体断片は、さらに蛋白質工学的手法により、二本の完全なH鎖および二本の完全なL鎖からなるヒト抗体分子へ変換することもできる。

ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組み込まれた動物を意味する。具体的には、マウス ES 細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該 ES 細胞をマウスの初期胚に移植後、発生させることにより作製されたヒト抗体産生トランスジェニックマウスなどがあげられる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体の作製方法は、通常の細胞融合法によるハイブリドーマ作製方法により、ヒト抗体産生ハイブリドーマを得、培養することで培養物中にヒト抗体を産生蓄積させることができる。

トランスジェニック非ヒト動物は、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル又はウサギ等があげられる。

本発明における抗体断片としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、Diabody、dsFv、CDR を含むペプチドなどがあげられる。

Fab は、IgG を蛋白質分解酵素パパインで処理して得られる断片のうち (H 鎖の 224 番目のアミノ酸残基で切断される)、H 鎖の N 末端側約半分と L 鎖全体がジスルフィド結合 (S-S 結合) で結合した分子量約 5 万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明における Fab は、本発明の CCR4 に特異的に反応するヒト型 CDR 移植抗体を蛋白質分解酵素パパインで処理して得ることができる。または、該抗体の Fab をコードする DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、Fab を製造することができる。

F(ab')₂ は、IgG を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち (H 鎖の 234 番目のアミノ酸残基で切断される)、Fab がヒンジ領域の S-S 結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約 10 万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明における F(ab')₂ は、本発明の CCR4 に特異的に反応するヒト型 CDR 移植抗体を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得ることができる。または、下記の Fab' をチオエーテル結合あるいは S-S 結合させ、作製することができる。

Fab' は、上記 F(ab')₂ のヒンジ領域の S-S 結合を切断した分子量約 5 万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明における Fab' は、本発明の CCR4 に特異的に結合する F(ab')₂ を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、CCR4 に特異的に反応するヒト型 CDR 移植抗体の Fab' をコードする DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

scFv は、1 本の VH と 1 本の VL とを 12 残基以上の適当なペプチドリンカー (P) を用いて連結した、VH-P-VL ないしは VL-P-VH ポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明における scFv は、CCR4 に特異的に結合するヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA を取得し、scFv をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

Diabody は、抗原結合特異性の同じまたは異なる scFv が 2 量体を形成した抗体断片で、同じ抗原に対する 2 価の抗原結合活性または異なる抗原に対する 2 特異的な抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明における Diabody は、例えば、CCR4 に特異的に結合する 2 価の Diabody は、本発明の CCR4 に特異的に結合するヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA を取得し、3～10 残基のポリペプチドリンカーを有する scFv をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより Diabody を発現させ、製造することができる。

dsFv は、VH および VL 中のそれぞれ 1 アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間の S-S 結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基は Reiter らにより示された方法 (Protein Engineering, 7, 697 (1994)) に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。

本発明における dsFv は、CCR4 に特異的に結合するヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA を取得し、dsFv をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

CDR を含むペプチドは、VH または VL の CDR の少なくとも 1 領域以上を含んで構成される。複数の CDR を含むペプチドは、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることにより製造することができる。

本発明における CDR を含むペプチドは、CCR4 に特異的に結合するヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL の CDR をコードする cDNA を構築し、該 cDNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。また、CDR を含むペプチドは、Fmoc 法 (フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc 法 (t-ブチルオキシカルボニル法) などの化学合成法によって製造することもできる。

本発明に用いられる薬剤としては、蛋白質、低分子の薬剤などがあげられる。

蛋白質としては、サイトカイン、抗体などがあげられる。

サイトカインとしては、免疫担当細胞である NK 細胞、マクロファージ、単球、顆粒球などのエフェクター細胞を活性化するサイトカイン、または当該サイトカインの誘導体などがあげられる。具体的なサイトカインとしては、インターロイキン-2 (IL-2)、IFN- α 、IFN- γ 、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、fractalkine、M-CSF、GM-CSF、G-CSF、TNF- α 、TNF- β 、IL-1 α 、IL-1 β などがあげられる。

抗体としては、T 細胞表面マーカーに特異的に反応する抗体、抗体断片または融合抗体などがあげられる。具体的な抗体としては、抗 CD3 抗体 (Orthoclone 社)、抗 CD4 抗体、抗 CD5 抗体、抗 CD8 抗体、抗 CD30 抗体、抗 CD2 抗体、抗 CD25 抗体 (Zenapax, Hoffmann La Roche 社)、抗 CD52 抗体 (Campath, Ilex Oncology 社) などがあげられる。

本発明に用いられる低分子の薬剤としては、アミフォスチン (エチオール) [amifostine (ethylol)]、シスプラチン (cisplatin)、ダカルバジン (DTIC) [dacarbazine (DTIC)]、ダクチノマイシン (dactinomycin)、メクロレタミン (ナイトロジェンマスタード) [mechlorethamine (nitrogen mustard)]、ストレプトゾシン (streptozocin)、シクロフォスファミド (cyclophosphamide)、カルムスチン (BCNU) [carmustine (BCNU)]、ロムスチン (CCNU) [lomustine (CCNU)]、ドキシソルピシン (アドリアマイシン) [doxorubicin (adriamycin)]、

ドキシソルビシンリポ (ドキシル) [doxorubicin lipo (doxil)]、ゲムシタビン (ゲムザール) [gemcitabine (gemzar)]、ダウノルビシン (daunorubicin)、ダウノルビシンリポ (ダウノゾーム) [daunorubicin lipo (daunoxome)]、プロカルバジン (procarbazine)、マイトマイシン (mitomycin)、シタラビン (cytarabine)、エトポシド (etoposide)、メトトレキセート (methotrexate)、5-フルオロウラシル (5-fluorouracil)、ビンブラスチン (vinblastine)、ビンクリスチン (vincristine)、ブレオマイシン (bleomycin)、パクリタキセル (タキソール) [paclitaxel (taxol)]、ドセタキセル (タキソテア) [docetaxel (taxotere)]、アルデスロイキン (aldesleukin)、アスパラギナーゼ (asparaginase)、ブスルファン (busulfan)、カルボプラチン (carboplatin)、クラドリビン (cladribine)、カンプトテシン (camptothecin)、CPT-11、10-ヒドロキシ-7-エチル-カンプトテシン (SN38) [10-hydroxy-7-ethyl-camptothecin (SN38)]、フロクスウリジン (floxuridine)、フルダラビン (fludarabine)、ヒドロキシウレア (hydroxyurea)、イホスファミド (ifosfamide)、イダルビシン (idarubicin)、メスナ (mesna)、イリノテカン (irinotecan)、ミトキサントロン (mitoxantrone)、トポテカン (topotecan)、ロイプロリド (leuprolide)、メゲストロール (megestrol)、メルファラン (melphalan)、メルカプトプリン (mercaptopurine)、プリカマイシン (plicamycin)、ミトタン (mitotane)、ペガスパラガーゼ (pegaspargase)、ペントスタチン (pentostatin)、ピポブロマン (pipobroman)、ストレプトゾシン (streptozocin)、タモキシフェン (tamoxifen)、テニポシド (teniposide)、テストラクトン (testolactone)、チオグアニン (thioguanine)、チオテパ (thiotepa)、ウラシルマスタード (uracil mustard)、ビノレルビン (vinorelbine)、クロラムブシル (chlorambucil)、プレドニゾロン (prednisolone)、ビンデシン (vindesine)、ニムスチン (nimustine)、セムスチン (semustine)、カペシタビン (capecitabine)、トムデックス (tomudex)、アザシチジン (azacytidine)、UFT、オキサロプラチン (oxaloplatin)、ゲフィチニブ (イレッサ) [gefitinib (Iressa)]、イマチニブ (STI571) [imatinib (STI571)]、アムサクリン (amsacrine)、オールートランスレチノイン酸 (all-trans retinoic acid)、サリドマイド (thalidomide)、ベキサロテン (ターグレチン) [bexarotene (targretin)]、デキサメタゾン (dexamethasone)、アナストロゾール (アリミデックス) [anastrozole (Alimidex)]、ロイプリン (leuplin) あるいはこれらの組み合わせがあげられる。望ましくは、ビンクリスチン、シクロフォスファミド、エトポシド、メトトレキセートあるいはこれらの組み合わせがあげられる。

上記の薬剤は、単独で高用量を生体内に投与した場合には副作用が懸念される。しかしながら、本発明においてはCCR4に特異的に結合する遺伝子組換え抗体およびその抗体断片と組み合わせることにより、上述の薬剤を低用量で用いることができる。したがって、十分な治療効果に加えて、副作用を軽減することができる。

本発明の医薬は、CCR4を発現している細胞に対して用いることができるが腫瘍細胞が好ましい。腫瘍の具体例としては、造血器腫瘍があげられる。

造血器腫瘍としては、急性白血病、慢性白血病、ホジキン病、非ホジキン病などがあげられる。

急性白血病としては、急性リンパ性白血病などがあげられ、急性リンパ性白血病には前駆 T 細胞系急性リンパ性白血病などがあげられる。

慢性白血病としては、慢性リンパ性白血病があげられ、慢性リンパ性白血病には、T 細胞型慢性リンパ性白血病、T 細胞型前リンパ性白血病、成人 T 細胞性白血病リンパ腫 (ATL)、セザリ-症候群などがあげられる。

非ホジキン病としては、T/NK 細胞性リンパ腫があげられ、T/NK 細胞性リンパ腫には前駆 T リンパ芽球型リンパ腫/白血病、成熟 T 細胞腫瘍などがあげられる。

成熟 T 細胞腫瘍としては、T 細胞前リンパ球性白血病、T 細胞大顆粒リンパ球性白血病、セザリ-症候群、菌状息肉腫、原発性皮膚未分化大細胞型リンパ腫、皮下蜂窩織炎様 T 細胞リンパ腫、腸管症型腸 T 細胞リンパ腫、肝脾 $\gamma \delta$ T 細胞リンパ腫、血管免疫芽球型 T 細胞リンパ腫、末梢性 T 細胞性リンパ腫、未分化型大細胞型リンパ腫、成人 T 細胞性白血病/リンパ腫などがあげられる。

本発明の医薬の効果は、in vitro の細胞障害活性測定系によって調べることができる。in vitro の細胞障害活性測定系の例としては、ADCC 活性の測定系が挙げられる。ADCC 活性は、抗体の存在下で、抗原である CCR4 を発現する標的細胞と、ヒトあるいはその他の動物より採取した末梢血単核球、単球、マクロファージ、顆粒球等のエフェクター細胞を接触させ、障害された標的細胞の度合いを検出し、これを定量することにより測定することができる。障害された標的細胞の度合いは、 ^{51}Cr 遊離法、標的細胞の酵素活性を検出する方法、フローサイトメーターによる検出法などによって検出することができる。ADCC 活性測定系における本発明の医薬の効果は、ADCC 活性測定系中に薬剤を添加するか、あるいは標的細胞、またはエフェクター細胞、またはその両者にあらかじめこれらの薬剤を一定期間曝露して ADCC 活性に与える影響を観察することにより、測定することができる。

また本発明の医薬の効果は、動物モデルを用いた in vivo 抗腫瘍活性を測定することによっても調べることができる。

動物モデルとしては、ヌードマウス等の免疫不全マウスにヒト癌組織由来の培養細胞株を移植した異種移植モデル、培養マウス癌細胞株を正常な免疫系を有する野生型マウスへ移植した同系移植モデルなどがあげられる。

異種移植モデルはヌードマウス等の免疫不全マウスの皮下、皮内、腹腔内、静脈内等様々な部位にヒト癌細胞株を移植することにより作製することができる。

本発明の医薬の評価用の同系移植モデルは、EL4 細胞などのマウス培養細胞株に、CCR4 遺伝子を導入することにより、CCR4 陽性の形質転換株を作製し、該形質転換株を正常な免疫系を有する野生型マウスの様々な部位へ移植することにより作製することができる。

上記動物モデルを用いて抗体の単独投与、薬剤の単独投与の効果と、本発明の医薬の効果とを比較することにより、本発明の医薬の効果の評価することができる。

本発明の医薬は、単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができ、蛋白質製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は該医薬そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該医薬を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該医薬および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1回当たり抗体量として0.1~20mg/kgである。抗体と併用する薬剤は、単独で臨床に用いられる場合の投与量と同用量またはそれより少ない用量である。

図面の簡単な説明

第1図は抗CCR4抗体の細胞障害活性に対するサイトカインの増強効果を示す。縦軸は細胞障害活性を表す。■はサイトカイン非添加時、□はIL-2添加時、斜線はIL-15添加時の細胞障害活性をそれぞれ示す。バーは標準偏差を示す。

第2図はヌードマウスに移植したCCRF-CEM細胞に対する抗CCR4抗体とピンクリスチンの併用効果を示す。縦軸はV/V0の値を表す。□は陰性対照群、斜線はKM2760投与群、灰色はピンクリスチン投与群、■はKM2760とピンクリスチンの併用投与群のV/V0の値をそれぞれ示す。バーは標準偏差を示す。

第3図はヌードマウスに移植したCCRF-CEM細胞に対する抗CCR4抗体とシクロフォスファミドの併用効果を示す。縦軸はV/V0の値を表す。□は陰性対照群、斜線はKM2760投与群、灰色

はシクロフォスファミド投与群、■は KM2760 とシクロフォスファミドの併用投与群の V/V0 の値をそれぞれ示す。バーは標準偏差を示す。

第 4 図はヌードマウスに移植した CCRF-CEM 細胞に対する抗 CCR4 抗体とエトポシドの併用効果を示す。縦軸は V/V0 の値を表す。□は陰性対照群、斜線は KM2760 投与群、灰色はエトポシド投与群、■は KM2760 とエトポシドの併用投与群の V/V0 の値をそれぞれ示す。バーは標準偏差を示す。

第 5 図はヌードマウスに移植した CCRF-CEM 細胞に対する抗 CCR4 抗体とメトトレキサートの併用効果を示す。縦軸は V/V0 の値を表す。□は陰性対照群、斜線は KM2760 投与群、灰色はメトトレキサート投与群、■は KM2760 とメトトレキサートの併用投与群の V/V0 の値をそれぞれ示す。バーは標準偏差を示す。

第 6 図は C57BL/6 マウスに移植した CCR4/EL4 細胞に対する抗 CCR4 抗体と G-CSF の併用効果を示す。横軸は腫瘍移植後の日数、縦軸は腫瘍体積をそれぞれ表す。×は陰性対照群、▲は KM2760 単独群、●は G-CSF 単独群、□は併用群をそれぞれ示す。バーは標準偏差を示す。

第 7 図は C57BL/6 マウスに移植した CCR4/EL4 細胞に対する抗 CCR4 抗体と IFN- α の併用効果を示す。縦軸は肝臓重量比率を表す。バーは標準偏差を示す。

以下、本発明を詳細に説明する。本願は、2003 年 12 月 4 日および 2004 年 5 月 25 日に出願された日本国特許出願 2003-406590 号および 2004-155141 の優先権を主張するものであり、当該特許出願の明細書及び／または図面に記載される内容を包含する。

発明を実施するための最良の形態

実施例 1 in vitro 細胞障害活性における抗 CCR4 抗体とサイトカインとの併用効果

in vitro 細胞障害活性における抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体 KM2760 (FERM BP-7054、WO01/64754) とサイトカインとの併用効果を以下の方法により測定した。

(a) エフェクター細胞溶液の調製

健康人静脈血 50mL を採取し、ヘパリンナトリウム (清水製薬社製) 0.5mL を加え穏やかに混合した。これを MONO-POLY 分離溶液 (大日本製薬株式会社製) を用いて添付の説明書に従って、単核球層を分離した。RPMI1640-FCS (5) 培地 [FCS を 5% 含む RPMI1640 培地 (GIBCO BRL 社)] で 3 回遠心分離して洗浄後、同培地を用いて 3×10^6 細胞/mL の濃度になるように再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

(b) エフェクター細胞のサイトカインによる刺激

上記 (a) で得られたエフェクター細胞溶液を 50 μ L ずつ、96 穴 U 底プレート (Falcon 社製) に分注した。さらに RPMI1640-FCS (5) 培地で希釈した 2ng/mL の IL-2 (ペプロテック社製) 溶液、2ng/mL の IL-15 (ペプロテック社製) 溶液およびサイトカイン非添加の陰性対照である RPMI1640-FCS (5) を各々 50 μ L ずつ別のサンプルに添加し、5%CO₂ インキュベーター内にて 3 日間静置した。

(c) 標的細胞溶液の調製

G418 (ナカライテスク社製) を 0.5mg/mL で含む RPMI1640-FCS (10) 培地 [FCS を 10% 含む RPMI1640 培地 (GIBCO BRL 社製)] で培養した、マウス胸腺腫細胞株 EL4 にヒト CCR4 遺伝子を導入した形質転換株である腫瘍細胞である CCR4/EL4 細胞 (WO01/64754) を遠心分離操作及び懸濁

により RPMI1640-FCS (5) 培地で洗浄した後、RPMI1640-FCS (5) 培地で 2×10^5 細胞/mL の濃度に調整し、標的細胞溶液とした。

(d) 細胞障害活性の測定

上記(b)でサイトカインによる刺激を与えたエフェクター細胞を含む 96 ウェル U 字底プレート各ウェルに (c) で調製した標的細胞溶液を 1×10^4 細胞/ウェルになるように $50 \mu\text{L}$ を添加した。このときエフェクター細胞と標的細胞の比は 15:1 となる。更に、KM2760 を最終濃度がそれぞれ 1 あるいは 100 ng/mL となるように添加して、 37°C で 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清中の乳酸デヒドロゲナーゼ (以下、LDH と称す) 活性を、CytoTox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega 社製) を用いて、添付の説明書に従って吸光度データを取得することで測定した。標的細胞自然遊離の吸光度データは、エフェクター細胞溶液および抗体溶液の代わりにそれぞれ同容量の RPMI1640-FCS (5) 培地を用いて、また、エフェクター細胞自然遊離の吸光度データは、標的細胞溶液および抗体溶液の代わりにそれぞれ同容量の RPMI1640-FCS (5) 培地を用いて、上記と同様の操作を行うことで取得した。標的細胞全遊離の吸光度データは、抗体溶液およびエフェクター細胞溶液の代わりにそれぞれ同容量の RPMI1640-FCS (5) 培地を用いて反応を行い、反応終了 45 分前に $15 \mu\text{L}$ の 9% Triton X-100 溶液を添加し、上記と同様の操作を行うことで、上清の LDH 活性を測定した。ADCC 活性は次式により求めた。

(式 1)

$$\text{細胞障害活性 (\%)} = \left[(\text{検体の吸光度}) - (\text{エフェクター細胞自然遊離の吸光度}) - (\text{標的細胞自然遊離の吸光度}) \right] / \left[(\text{標的細胞全遊離の吸光度}) - (\text{標的細胞自然遊離の吸光度}) \right] \times 100$$

第 1 図に結果を示した。KM2760 の細胞障害活性は濃度依存的に増加していた。また、サイトカインの添加により、より増加した。この結果は、抗 CCR4 抗体の細胞障害活性が、エフェクター細胞を活性化するサイトカインによって増強されることを示している。

実施例 2 抗 CCR4 抗体とビンクリスチンとの併用投与による抗腫瘍効果

CCRF-CEM 細胞 (ヒト T 細胞白血病細胞株) を 2×10^8 個/mL で RPMI1640 培地 (Gibco BRL) に懸濁し、該懸濁液 $100 \mu\text{L}$ を Balb/c ノードマウス (日本クレア、雄) の腹側部皮内に移植した。細胞移植後 15 日目にノギスによる腫瘍径の測定を行い、次式より腫瘍体積を算出した。

(式 2)

$$\text{腫瘍体積} = \text{短径} \times \text{短径} \times \text{長径} \times 0.5$$

腫瘍体積が $140 \sim 342 \text{ mm}^3$ (平均 260 mm^3) の範囲内の腫瘍を有する個体を選抜し、平均腫瘍体積が均一になるように群分けした後に、下記の A~D の各薬剤をマウスへ投与した。なお、群分けした日を Day0 とした。

A. 陰性対照群 : 非投与

B. KM2760 単独群 : Day0 と Day4 に 1 匹あたり $800 \mu\text{g}$ 投与した。

C. ビンクリスチン (以下 VCR; オンコピン注射用、日本イーライリリー株式会社)

単独群 : Day0 に 1 匹あたり 0.55 mg/kg 投与した。

D. KM2760 + VCR 併用群 : VCR を、Day0 に 1 匹あたり 0.55 mg/kg、KM2760 を、Day0 と Day4 に 1 匹あたり 800 μ g それぞれ投与した。

実験は各群 5 匹で行った。各薬剤は生理食塩水（大塚製薬）で希釈調製し、尾静脈内より投与した。Day10 に腫瘍体積の測定を行い、抗腫瘍効果の判定は、各群の Day0 の腫瘍体積を V_0 としたときの Day10 の腫瘍体積変化 (V/V_0) の平均値の比較で行った。

各群の V/V_0 の平均値を第 2 図に示す。第 2 図に示したように、KM2760 と VCR との併用投与は、VCR 単独あるいは抗体単独よりも高い増殖抑制効果を示した。

各群の V/V_0 を陰性対照群の V/V_0 で除した値 (T/C) を第 1 表に示す。KM2760、VCR 両薬剤の薬効が単純に加算された時の T/C の理論値、すなわち各薬剤単独群の T/C を掛け合わせた値と比べると、実際の併用群の T/C (表中の C) は、Day10 において理論値である 0.21 よりも低い値 (0.11) を示した。

第 1 表

各群の T/C

A 陰性対照	B KM2760	C VCR	D KM2760+VCR	理論値 ($B \times C$)
1	0.43	0.49	0.11	0.21

以上より、KM2760 と VCR の併用投与は、それぞれ単独投与より、高い抗腫瘍効果を有し、相乗効果を示すことが明らかとなった。

実施例 3 抗 CCR4 抗体とシクロフォスファミドとの併用投与による抗腫瘍効果

CCRF-CEM 細胞 (ヒト T 細胞白血病細胞株) を 2×10^8 個/mL で RPMI1640 培地 (Gibco BRL) に懸濁し、該懸濁液 100 μ L を Balb/c ノードマウス (日本クレア、雄) の腹側部皮内に移植した。細胞移植後 18 日目にノギスによる腫瘍径の測定を行い、実施例 2 の式 2 により腫瘍体積を算出した。

腫瘍体積が 116~349 mm^3 (平均 219 mm^3) の範囲内の個体を選抜し、平均腫瘍体積が均一になるように群分けした後に、下記の A~D の各薬剤をマウスへ投与した。群分けした日を Day0 とした。

A. 陰性対照群 : 非投与

B. KM2760 単独群 : Day0 と Day4 に 1 匹あたり 800 μ g 投与した。

C. シクロフォスファミド (以下 CPA; 注射用エンドキサン、バクスター社)

単独群 : Day0 に 1 匹あたり 65 mg/kg 投与した。

D. KM2760 + CPA 併用群 : CPA を、Day0 に 1 匹あたり 65 mg/kg、KM2760 を、Day0 と Day4 に 1 匹あたり 800 μ g それぞれ投与した。

実験は各群 5 匹で行った。各薬剤は生理食塩水（大塚製薬）で希釈調製し、尾静脈内より投与した。Day4 に腫瘍体積の測定を行い、抗腫瘍効果の判定は、各群の Day0 の腫瘍体積を V_0 としたときの各測定日の腫瘍体積変化 (V/V_0) の平均値の比較で行った。

各群の V/V_0 の平均値の経日的推移を第 3 図に示す。第 3 図に示したように、KM2760 と CPA との併用投与は、CPA 単独あるいは抗体単独よりも高い増殖抑制効果を示した。

各群の V/V_0 を陰性対照群の V/V_0 で除した値 (T/C) を第 2 表に示す。KM2760、CPA 両薬剤の薬効が単純に加算された時の T/C の理論値、すなわち各薬剤単独群の T/C を掛け合わせた値と比べると、実際の併用群の T/C (表中の D の値) は理論値である 0.39 よりも低い値 (0.35) を示した。

第 2 表

各群の T/C

A 陰性対照	B KM2760	C CPA	D KM2760+CPA	理論値 ($B \times C$)
1.00	0.80	0.48	0.35	0.39

以上より、KM2760 と CPA との併用投与は、それぞれ単独投与より、高い抗腫瘍効果を有し、相乗効果を示すことが明らかとなった。

実施例 4 抗 CCR4 抗体とエトポシドの併用投与による抗腫瘍効果

CCRF-CEM 細胞 (ヒト T 細胞白血病細胞株) を 2×10^8 個/mL で RPMI1640 培地 (Gibco BRL) に懸濁し、該懸濁液 100 μ L を Balb/c ヌードマウス (日本クレア、雄) の腹側部皮内に移植した。細胞移植後 17 日目にノギスによる腫瘍径の測定を行い、実施例 2 の式 2 により腫瘍体積を算出した。

腫瘍体積が 121~348 mm^3 (平均 195 mm^3) の範囲内の個体を選抜し、平均腫瘍体積が均一になるように群分けした後、下記の A~D の各薬剤をマウスへ投与した。なお、群分けした日を Day0 とした。

A. 陰性対照群 : 非投与

B. KM2760 単独群 : Day0 と Day4 に 1 匹あたり 800 μ g 投与した。

C. エトポシド (以下 VP-16; ラステット注、日本化薬株式会社) 単独群 : Day0 から Day4 の 5 日間、1 匹あたり 10 mg/kg 投与した。

D. KM2760 + VP-16 併用群 : VP-16 を、Day0 から Day4 の 5 日間、1 匹あたり 10 mg/kg、KM2760 を、Day0 と Day4 に 1 匹あたり 800 μ g 投与した。

実験は各群 5 匹で行った。各薬剤は生理食塩水 (大塚製薬) で希釈調製し、尾静脈内より投与した。Day7 に腫瘍体積の測定を行い、抗腫瘍効果の判定は、各群の Day0 の腫瘍体積を V_0 としたときの Day7 の腫瘍体積変化 (V/V_0) の平均値の比較で行った。

各群の V/V_0 の平均値を第 4 図に示す。第 4 図に示したように、KM2760 と VP-16 との併用投与は、VP-16 単独あるいは抗体単独よりも高い増殖抑制効果を示した。

各群の V/V_0 を陰性対照群の V/V_0 で除した値 (T/C) を第 3 表に示す。KM2760、VP-16 両薬剤の薬効が単純に加算された時の T/C の理論値、すなわち各薬剤単独群の T/C を掛け合わせた値と比べると、実際の併用群の T/C (表中の D の値) は理論値である 0.46 よりも低い値 (0.38) を示した。

第 3 表

各群の T/C

A 陰性対照	B KM2760	C VP-16	D KM2760+VP-16	理論値 (B×C)
1.00	0.65	0.71	0.38	0.46

以上より、KM2760 と VP-16 との併用投与は、それぞれ単独投与より、高い抗腫瘍効果を有し、相乗効果を示すことが明らかとなった。

実施例 5 抗 CCR4 抗体とメトトレキサートの併用投与による抗腫瘍効果

CCRF-CEM 細胞(ヒト T 細胞白血病細胞株)を 2×10^8 個/mL で RPMI1640 培地 (Gibco BRL) に懸濁し、該懸濁液 100 μ L を Balb/c ヌードマウス (日本クレア、雄) の腹側部皮内に移植した。細胞移植後 17 日目にノギスによる腫瘍径の測定を行い、式 2 により腫瘍体積を算出した。

腫瘍体積が 121~348 mm³ (平均 195 mm³) の範囲内の個体を選抜し、平均腫瘍体積が均一になるように群分けした後に、下記の A~D の各薬剤をマウスへ投与した。群分けした日を Day0 とした。

A. 陰性対照群 : 非投与

B. KM2760 単独群 : Day0 と Day4 に 1 匹あたり 800 μ g 投与した。

C. methotrexate (以下 MTX; メソトレキサート注射液、日本ワイスレダリー株式会社)
単独群 : Day0 から Day4 の 5 日間、1 匹あたり 15 mg/kg 投与した。

D. KM2760 + MTX 併用群 : MTX を、Day0 から Day4 の 5 日間、1 匹あたり 15 mg/kg、KM2760 を、Day0 と Day4 に 1 匹あたり 800 μ g それぞれ投与した。

実験は各群 5 匹で行った。各薬剤は生理食塩水 (大塚製薬) で希釈調製し、尾静脈内より投与した。Day7 に腫瘍体積の測定を行い、抗腫瘍効果の判定は、各群の Day0 の腫瘍体積を V0 としたときの腫瘍体積変化 (V/V0) の平均値の比較で行った。

各群の V/V0 の平均値の経日的推移を第 5 図に示す。第 5 図に示したように、KM2760 と MTX との併用投与は、MTX 単独あるいは抗体単独よりも高い増殖抑制効果を示した。

各群の V/V0 を陰性対照群の V/V0 で除した値 (T/C) を第 4 表に示す。KM2760、MTX 両薬剤の薬剤が単純に加算された時の T/C の理論値、すなわち各薬剤単独群の T/C を掛け合わせた値と比べると、実際の併用群の T/C (第 4 表中の D の値) は理論値 0.04 よりも低い値 (0.01) を示した。

第 4 表

各群の T/C

A 陰性対照	B KM2760	C MTX	D KM2760+MTX	理論値 (B×C)
1.00	0.65	0.06	0.01	0.04

以上より、KM2760 と MTX との併用投与は、それぞれ単独投与より、高い抗腫瘍効果を有し、相乗効果を示すことが明らかとなった。

実施例 6 抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体 KM2760 と G-CSF の併用投与による抗腫瘍効果

CCR4/EL4 細胞(W001/64754)を 1×10^6 個/mL で RPMI1640 培地 (Gibco BRL) に懸濁し、該懸濁液 100 μ L を C57BL/6 マウス (日本クレア、雄、8 週齢) の右側腹側部皮内に移植した。さらに

A～Dまで群分けした後、各マウスにA～Dの各薬剤を投与した。なお、腫瘍を移植した日をDay 0とした。

- A. 陰性対照群：非投与
 B. KM2760 単独群：Day0 と Day4 に 1 匹あたり 100 μ g を静脈内投与した。
 C. G-CSF 単独群：腫瘍移植日 4 日前（以下、Day-4 と記す）から Day5 までの 10 日間、G-CSF（ノイアップ注 100、協和発酵工業社製）を 1 日 1 回、1 匹あたり 10 μ g を皮下投与した。
 投与部位は腫瘍移植部位と重ならない右側腹側部の後肢付近である。
 D. KM2760 + G-CSF 併用群：KM2760 を Day0 と Day4 に 1 日 1 回、1 匹あたり 100 μ g で静脈内投与し、G-CSF を Day-4 から Day5 までの 10 日間、1 日 1 回、1 匹あたり 10 μ g を皮下投与した。
 投与部位は腫瘍移植部位と重ならない右側腹側部の後肢付近である。

実験は A 群 10 匹、B、C、D 群は各 7 匹で行った。KM2760 はクエン酸緩衝液（10mM クエン酸、150mM 塩化ナトリウム、pH6）、G-CSF は生理食塩水（大塚製薬）で希釈調製し、それぞれ 100 μ L ずつ投与した。各群の Day0 より経日的にノギスによる腫瘍径の測定を行い、実施例 2 の式 2 に示す式により、腫瘍体積を算出した。

Day17 以降に A 群ではマウスの腫瘍死が始まったため、腫瘍体積の評価は Day14 で終了した。

各群の腫瘍体積の平均値の経日的推移を第 6 図に示す。第 6 図に示したように、B 群および C 群においては未処理の A 群に対して弱い抗腫瘍効果しか見られないものの、D 群においては顕著な抗腫瘍効果が観察された。

さらに評価最終日における T/C 値を第 5 表に示す。各群における抗腫瘍効果の判定（T/C 値）は、評価最終日（Day14）における A 群の腫瘍体積の平均値に対する各群の腫瘍体積の平均値の比（T/C 値）の比較を行うため、以下の式 3 に従い算出した。

（式 3）

$$(T/C \text{ 値}) = (\text{Day14 の各群の腫瘍体積の平均値}) / (\text{Day14 の A 群の腫瘍体積の平均値})$$

KM2760、G-CSF 両薬剤の薬効が単純に加算された時の T/C 値の理論値、すなわち各薬剤単独群の T/C 値を掛け合わせと比べると、実際の併用群の T/C 値（表中の C）は、理論値である 0.30 よりも低い値（0.10）を示した。

第 5 表

群	A	B	C	D	理論値 (B×C)
T/C 値	1.0	0.48	0.63	0.10	0.30

以上より、KM2760 と G-CSF との併用投与は、それぞれの単独投与より、高い抗腫瘍効果を示し、相乗効果を示すことが明らかとなった。

実施例 7 抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体 KM2760 と IFN- α の併用投与による抗腫瘍効果

CCR4/EL4 細胞を 5×10^5 個/mL で RPMI1640 培地（Gibco BRL 社製）に懸濁し、該懸濁液 100 μ L を C57BL/6 マウス（日本クレア、雄、8 週齢）の尾静脈内に移植した。さらにマウスを下記 A～D まで群分けした後、各マウスに A～D の各薬剤を投与した。なお、腫瘍を移植した日を Day 0 とした。

- A. 陰性対照群：非投与

- B. IFN- α 単独群: IFN- α (Universal type I interferon, PBL バイオメディカルラボラトリー社製) を Day1 から Day5 の 5 日間、1 日 1 回、1 匹あたり 5×10^4 units を静脈内投与した。
- C. KM2760 単独群: KM2760 を Day1 と Day5 に 1 日 1 回、1 匹あたり $0.5 \mu\text{g}$ で静脈内投与した。
- D. KM2760 + IFN- α 併用群: KM2760 を Day1 と Day5 に 1 日 1 回、1 匹あたり $0.5 \mu\text{g}$ で静脈内投与し、IFN- α を Day1 から Day5 の 5 日間、1 日 1 回、1 匹あたり 5×10^4 units で静脈内投与した。

実験は A 群 7 匹、B、C、D 群は各 6 匹で行った。KM2760 はクエン酸緩衝液 (10mM クエン酸、150mM 塩化ナトリウム、pH6)、IFN- α は 0.1% ウシ血清アルブミンを含む PBS で希釈調製し、それぞれ $100 \mu\text{L}$ ずつ投与した。Day14 に全てのマウスの体重を測定し、エーテル麻酔と放血を行った後に頸椎脱臼して安楽死させて、肝臓を摘出したのち肝臓重量を測定し、各個体の体重に対する肝臓重量の割合 (以降、肝臓重量比率と称する) を百分率で算出した。

抗腫瘍効果の評価は、同時に測定した未処理の健康なマウスの肝臓重量比率 (6 匹の平均値) に対し、腫瘍細胞の転移によって増加した各群の肝臓重量比率を比較することにより行った。

各群の肝臓重量比率を第 7 図に示す。第 7 図に示したように、B 群および C 群においては未処理の A 群に対して弱い抗腫瘍効果しか見られないものの、D 群においては顕著な抗腫瘍効果が観察された。

さらに各群における肝臓中の腫瘍細胞の残存の程度を、T/C 値として下式に従い算出した。

(式 4)

$$T/C = (\text{各群の肝臓重量比率の平均値} - \text{未処理マウス肝臓重量比率の平均値}) / (\text{陰性対照群の肝臓重量比率の平均値} - \text{未処理マウス肝臓重量比率の平均値})$$

得られた T/C 値を表 6 に示す。KM2760、IFN- α 両薬剤の薬効が単純に加算された時の T/C 値の理論値、すなわち各薬剤単独群の T/C 値を掛け合わせた値と比べると、実際の併用群の T/C 値 (表中の C) は、理論値である 0.25 よりも低い値 (0.088) を示した。

第 6 表

群	A	B	C	D	理論値 (B×C)
T/C 値	1.0	0.48	0.52	0.088	0.25

以上より、KM2760 と IFN- α の併用投与は、それぞれの単独投与より、高い抗腫瘍効果を有し、相乗効果を示すことが明らかとなった。

実施例 8 抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体 KM2760 と M-CSF の併用投与による抗腫瘍効果

CCR4/EL4 細胞 (W001/64754) を 1×10^5 個/mL で RPMI1640 培地 (Gibco BRL 社製) に懸濁し、該懸濁液 $200 \mu\text{L}$ を C57BL/6 マウス (日本クレア、雄、8 週齢) の腹腔内に移植した。さらに下記の A~D に群分けした後、各マウスに A~D の各薬剤を投与した。腫瘍を移植した日を Day0 とした。

A. 陰性対照群: 非投与

B. M-CSF 単独群: M-CSF (ロイコプロール、協和醗酵工業社製) を Day-3 から Day-1 まで 1 日 2 回、Day0 は 1 日 1 回、計 7 回、1 匹あたり $100 \mu\text{g}$ で腹腔内投与した。

- C. KM2760 単独群: KM2760 を Day0 に 1 日 1 回、1 匹あたり 50 μ g で腹腔内投与した。
- D. KM2760 + M-CSF 併用群: KM2760 を Day0 に 1 日 1 回、1 匹あたり 50 μ g で腹腔内投与し、Day-3 から Day-1 まで 1 日 2 回、Day0 は 1 日 1 回、計 7 回、1 匹あたり 100 μ g で腹腔内投与した。

実験は各群 8 匹で行った。各薬剤は KM2760 はクエン酸緩衝液 (10mM クエン酸、150mM 塩化ナトリウム、pH6)、M-CSF は生理食塩水 (大塚製薬) で希釈調製し、100 μ L ずつ投与した。抗腫瘍効果の評価は、各群におけるマウスの生存日数の平均値の、陰性対照群の生存日数の平均値に対する割合 (以降、延命率と称する) で行った。各マウスの生存日数および各群の延命率を第 7 表に示す。

第 7 表

群	生存日数	平均生存日数	延命率
A	17, 18, 18, 19, 19, 20, 20, 22	19.3	1.00
B	17, 17, 18, 18, 18, 19, 19, 22	18.8	0.974
C	19, 21, 21, 21, 22, 24, 26, 27	22.9	1.19
D	25, 25, 25, 26, 26, 26, 27, >50	>28.8	>1.49 (理論値 1.16)

第 7 表に示したとおり、B 群では未処理の A 群と比較して抗腫瘍効果が現れず、C 群では弱い抗腫瘍効果しか見られないものの、D 群においては顕著な抗腫瘍効果が観察された。KM2760、M-CSF 両薬剤の薬効が単純に加算された時の延命率の理論値、すなわち各薬剤単独群の延命率を掛け合わせた値と比べると、実際の併用群の延命率 (表中の D) は理論値である 1.16 より高い値 (>1.49) を示した。なお、D 群中の 1 匹は、観察期間 (Day50) を超えてもなお生存していた。

以上より、KM2760 と M-CSF の併用投与は、それぞれの単独投与により、高い抗腫瘍効果を有し、相乗効果を示すことが明らかとなった。

産業上の利用可能性

ヒト CC ケモカイン受容体 4 (CCR4) に特異的に結合する遺伝子組換え抗体または該抗体断片と、少なくとも 1 種類の薬剤とを組み合わせる医薬が提供される。

配列番号 13-人工配列の説明: 抗体重鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 14-人工配列の説明: 抗体重鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 15-人工配列の説明: 抗体軽鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 16-人工配列の説明: 抗体重鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 17-人工配列の説明: 抗体重鎖可変領域アミノ酸配列

配列番号 18-人工配列の説明: 抗体軽鎖可変領域アミノ酸配列

請求の範囲

1. ヒト CC ケモカイン受容体 4 (CCR4) に特異的に結合する遺伝子組換え抗体または該抗体断片と、少なくとも 1 種類の薬剤とを組み合わせる医薬。
2. CCR4 に特異的に結合する遺伝子組換え抗体または該抗体断片と、少なくとも 1 種類の薬剤とを併用して投与するための医薬。
3. CCR4 に特異的に結合する遺伝子組換え抗体または該抗体断片と、少なくとも 1 種類の薬剤とを同時に又は逐次的に投与するための医薬。
4. 医薬が、抗腫瘍剤であることを特徴とする請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の医薬。
5. 腫瘍が CCR4 を発現している腫瘍である請求項 4 に記載の医薬。
6. CCR4 が発現している腫瘍が造血器腫瘍である請求項 5 に記載の医薬。
7. CCR4 に特異的に結合する遺伝子組換え抗体または該抗体断片が、CCR4 の細胞外領域に特異的に結合し、ヒト血小板に反応性を示さない抗体である請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の医薬。
8. CCR4 の細胞外領域に特異的に結合する遺伝子組換え抗体または該抗体断片が、CCR4 リガンドである TARC (thymus and activation-regulated chemokine) または MDC (macrophage-derived chemokine) の CCR4 への結合を阻害する活性を有さない請求項 7 に記載の医薬。
9. 細胞外領域が、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の 1～39、98～112、176～206 および 271～284 番目からなる群から選ばれる細胞外領域である請求項 7 または 8 に記載の医薬。
10. 細胞外領域が、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の 2～29 番目に存在するエピトープである請求項 7～9 のいずれか 1 項に記載の医薬。
11. 細胞外領域が、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の 13～29 番目に存在するエピトープである請求項 7～10 のいずれか 1 項に記載の医薬。
12. 細胞外領域が、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の 13～25 番目に存在するエピトープである請求項 7～11 のいずれか 1 項に記載の医薬。
13. CCR4 に特異的に結合する遺伝子組換え抗体または該抗体断片が、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の 13～25 番目を含むペプチドのうち、16、19、20 および 22 番目の少なくとも 1 つのチロシン残基が硫酸化されたペプチドへの結合性が配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の 13～25 番目を含むペプチドへの結合性よりも低いことを特徴とする請求項 12 に記載の医薬。
14. CCR4 の細胞外領域に特異的に結合する遺伝子組換え抗体または該抗体断片が、ハイブリドーマ KM2160 (FERM BP-10090) が生産するモノクローナル抗体が認識するエピトープに特異的に反応する抗体または該抗体断片である、請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の医薬。
15. ヒト型遺伝子組換え抗体がヒト型キメラ抗体またはヒト型 CDR 移植抗体である請求項 1～14 のいずれか 1 項に記載の医薬。
16. ヒト型キメラ抗体が CCR4 に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) および軽鎖 (L 鎖) V 領域の相補性決定領域 (CDR) を含む、請求項 15 に記載の医薬。
17. ヒト型キメラ抗体が配列番号 5、6、7 で表されるアミノ酸配列からなる抗体の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) の CDR1、CDR2、CDR3 および／またはそれぞれ配列番号 8、9、10 で表される

アミノ酸配列からなる軽鎖 (L 鎖) V 領域の CDR1、CDR2、CDR3 を含む請求項 15 または 16 に記載の医薬。

18. ヒト型キメラ抗体が配列番号 11 で表されるアミノ酸配列からなる抗体分子の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) および／または配列番号 12 で表される抗体分子の軽鎖 (L 鎖) V 領域を含む請求項 15～17 のいずれか 1 項に記載の医薬。

19. ヒト型 CDR 移植抗体が CCR4 に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) および軽鎖 (L 鎖) V 領域の相補性決定領域 (CDR) を含む、請求項 15 に記載の医薬。

20. ヒト型 CDR 移植抗体が配列番号 5、6、7 で表されるアミノ酸配列からなる抗体の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) の CDR1、CDR2、CDR3 および／またはそれぞれ配列番号 8、9、10 で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖 (L 鎖) V 領域の CDR1、CDR2、CDR3 を含む請求項 15 または 19 に記載の医薬。

21. ヒト型 CDR 移植抗体が配列番号 16 または 17 で示されるアミノ酸配列で表されるアミノ酸配列からなる抗体分子の重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) および／または配列番号 18 で表される抗体分子の軽鎖 (L 鎖) V 領域を含む、請求項 15、18 および 20 のいずれか 1 項に記載の医薬。

22. 薬剤が、蛋白質または低分子の薬剤である請求項 1～21 のいずれか 1 項に記載の医薬。

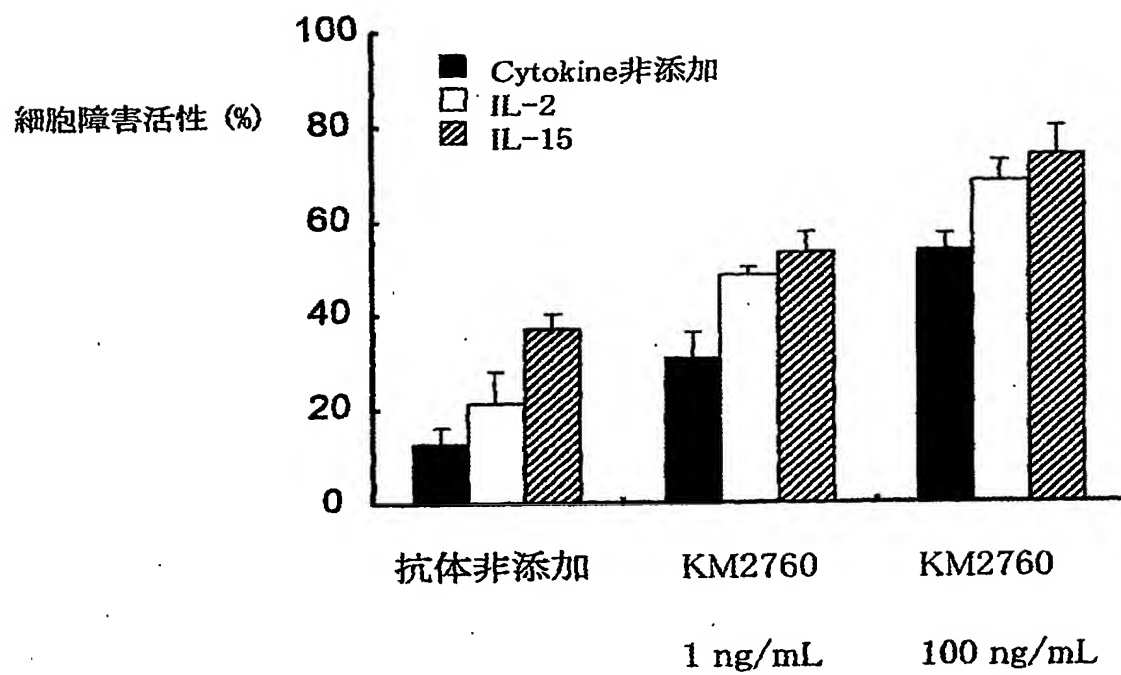
23. 蛋白質が、サイトカインまたは抗体である、請求項 22 記載の医薬。

24. サイトカインが、G-CSF、M-CSF、インターフェロン α 、IL-2 および IL-15 から選ばれたサイトカインである請求項 23 記載の医薬。

25. 低分子の薬剤が、化学療法剤またはホルモン療法剤である請求項 1～24 のいずれか 1 項に記載の医薬。

26. 化学療法剤が、ビンクリスチン、シクロフォスファミド、エトポシドおよびメトトレキサートから選ばれる薬剤である請求項 25 に記載の薬剤。

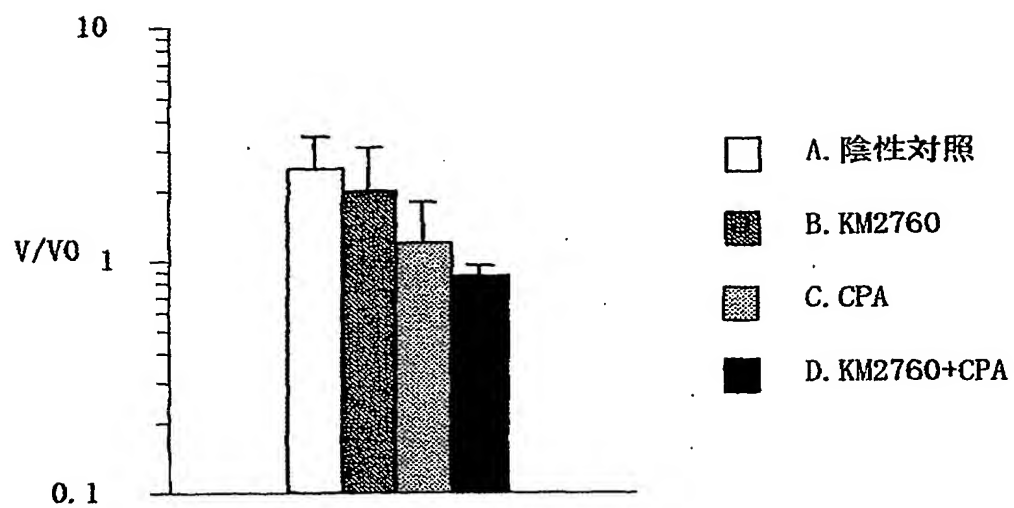
第 1 図



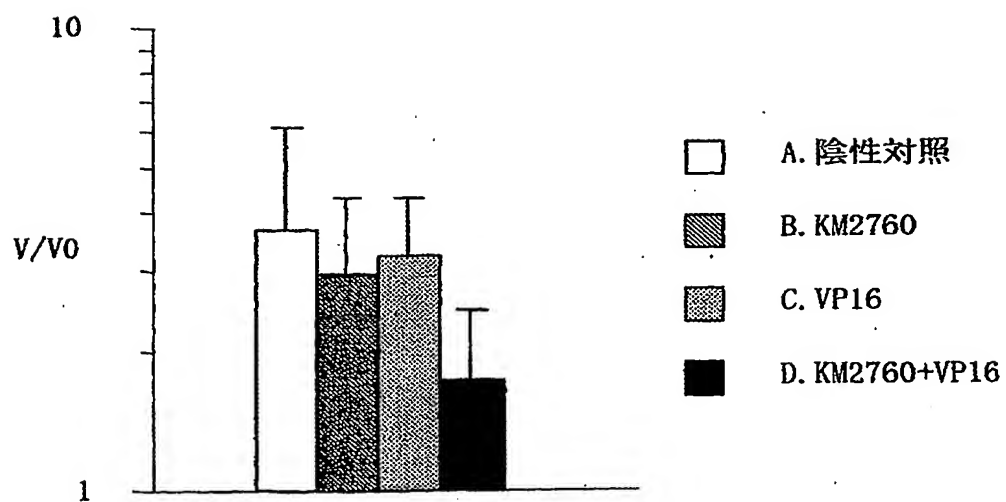
第 2 図



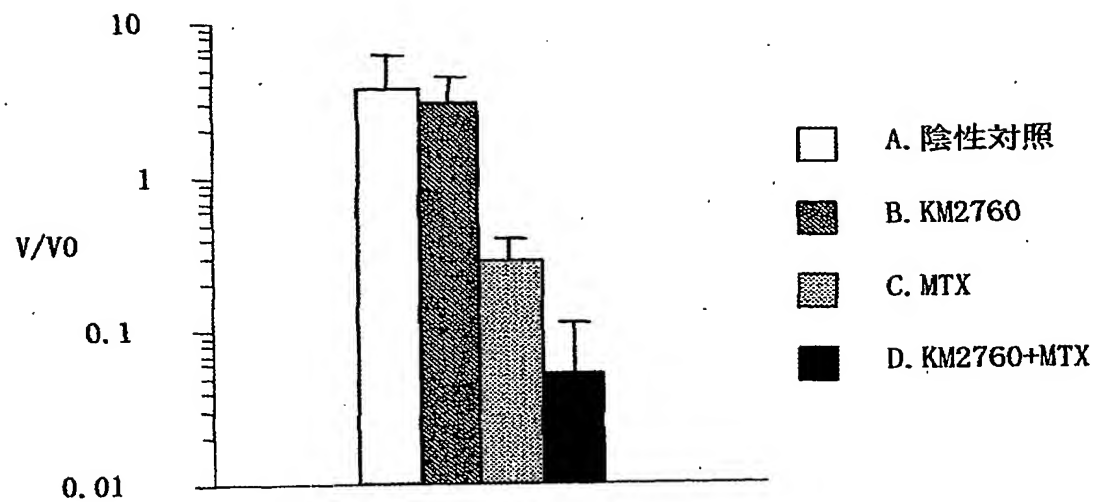
第 3 図



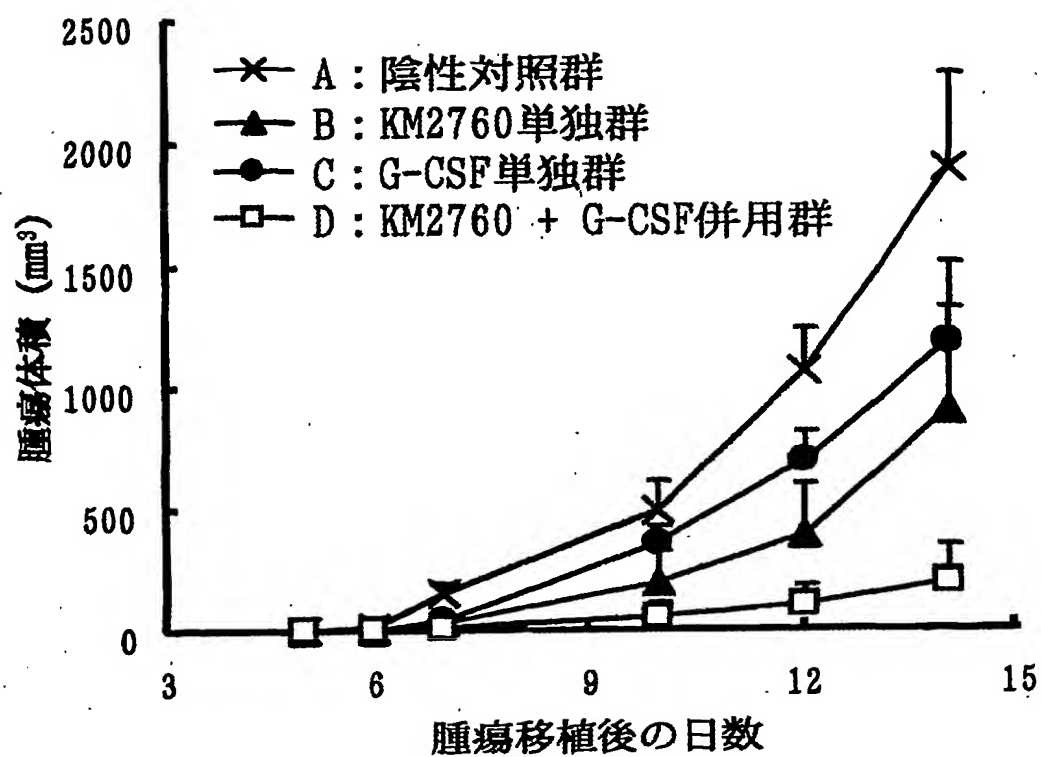
第 4 図



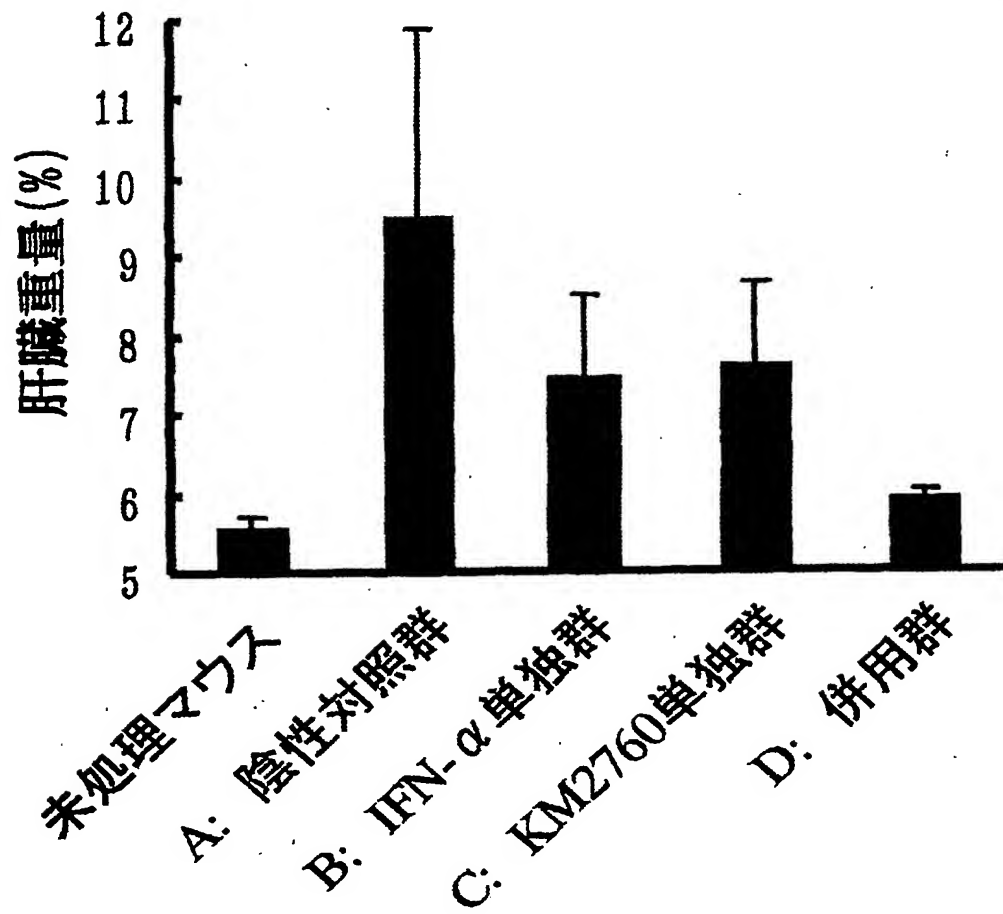
第 5 図



第 6 図



第 7 図



SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> Pharmaceutical composition comprising recombinant antibody against CCR4

<130> 11638W01

<150> JP2003-406590
JP2004-155141

<151> 2003-12-04
2004-05-25

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 360

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Asn Pro Thr Asp Ile Ala Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser Ile Tyr
1 5 10 15

Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys Thr Lys Glu
20 25 30

Gly Ile Lys Ala Phe Gly Glu Leu Phe Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu
35 40 45

Val Phe Val Phe Gly Leu Leu Gly Asn Ser Val Val Val Leu Val Leu
50 55 60

Phe Lys Tyr Lys Arg Leu Arg Ser Met Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn
 65 70 75 80

Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Val Phe Ser Leu Pro Phe Trp Gly
 85 90 95

Tyr Tyr Ala Ala Asp Gln Trp Val Phe Gly Leu Gly Leu Cys Lys Met
 100 105 110

Ile Ser Trp Met Tyr Leu Val Gly Phe Tyr Ser Gly Ile Phe Phe Val
 115 120 125

Met Leu Met Ser Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val Phe
 130 135 140

Ser Leu Arg Ala Arg Thr Leu Thr Tyr Gly Val Ile Thr Ser Leu Ala
 145 150 155 160

Thr Trp Ser Val Ala Val Phe Ala Ser Leu Pro Gly Phe Leu Phe Ser
 165 170 175

Thr Cys Tyr Thr Glu Arg Asn His Thr Tyr Cys Lys Thr Lys Tyr Ser
 180 185 190

Leu Asn Ser Thr Thr Trp Lys Val Leu Ser Ser Leu Glu Ile Asn Ile
 195 200 205

Leu Gly Leu Val Ile Pro Leu Gly Ile Met Leu Phe Cys Tyr Ser Met
 210 215 220

Ile Ile Arg Thr Leu Gln His Cys Lys Asn Glu Lys Lys Asn Lys Ala
 225 230 235 240

Val Lys Met Ile Phe Ala Val Val Val Leu Phe Leu Gly Phe Trp Thr
 245 250 255

Pro Tyr Asn Ile Val Leu Phe Leu Glu Thr Leu Val Glu Leu Glu Val
 260 265 270

Leu Gln Asp Cys Thr Phe Glu Arg Tyr Leu Asp Tyr Ala Ile Gln Ala
 275 280 285

Thr Glu Thr Leu Ala Phe Val His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Ile Tyr
 290 295 300

Phe Phe Leu Gly Glu Lys Phe Arg Lys Tyr Ile Leu Gln Leu Phe Lys
 305 310 315 320

Thr Cys Arg Gly Leu Phe Val Leu Cys Gln Tyr Cys Gly Leu Leu Gln
 325 330 335

Ile Tyr Ser Ala Asp Thr Pro Ser Ser Ser Tyr Thr Gln Ser Thr Met
 340 345 350

Asp His Asp Leu His Asp Ala Leu
 355 360

<210> 2

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Asn Pro Thr Asp Ile Ala Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser Ile Tyr Ser
 1 5 10 15

Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys
 20 25

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys
1 5 10 15

Pro Cys

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Asp Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro
1 5 10 15

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Asn Tyr Gly Met Ser
1 5

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr

1

5

10

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu

1

5

10

15

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1

5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Phe Gln Gly Ser Leu Leu Phe Trp Thr

1

5

<210> 11

<211> 138

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

Met Asn Leu Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly

1

5

10

15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Met Lys

20

25

30

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe

35

40

45

Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Met Arg Leu

50

55

60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro

65

70

75

80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn

85

90

95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Ile

100

105

110

Tyr Tyr Cys Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp

115

120

125

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

130

135

<210> 12

<211> 132

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15

Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile
 35 40 45

Val His Ile Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Arg Pro
 50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110

Phe Gln Gly Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu
 115 120 125

Glu Ile Arg Arg
 130

<210> 13

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 14

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 14

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 15

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile
20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 16

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 17

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 18

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 18

Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile

20	25	30
Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser		
35	40	45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro		
50	55	60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
65	70	75
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly		
85	90	95
Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
100	105	110

原本(出願用)

[この用紙は、国際出願の一部を構成せず、国際出願の用紙の枚数に算入しない]

0-1	様式 PCT/RO/134 (SAFE) この寄託された微生物又はその他の生物材料に関する表示 (PCT規則13の2)は、 右記によって作成された。	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.163)
0-2	国際出願番号	PCT/JP 2004/018430
0-3	出願人又は代理人の書類記号	1638

1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
1-1	記載頁	4
1-2	行	36
1-3	寄託の表示	
1-3-1	寄託機関の名称	IPOD (独)産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IPOD)
1-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6
1-3-3	寄託の日付	2004年 08月 12日 (12.08.2004)
1-3-4	受託番号	IPOD FERM BP-10090
1-4	追加の表示	ヨーロッパ特許条約施行規則28 (3) の規定に基づき、微生物が請求人により推薦された専門家にのみ試料分譲されることを可能とすることを出願人は希望する (Rule 28(4) EPC)
1-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国

受理官庁記入欄

0-4	この用紙は国際出願とともに受理した (はい/いいえ)	✓
0-4-1	権限のある職員	半田 捷子

国際事務局記入欄

0-5	この用紙が国際事務局に受理された日	23 DEC 2004
0-5-1	権限のある職員	蓮池 睦人

書式8(第7条第1項関係)

T/JP 2004/018430

「特許手続上の微生物の寄託等の国際的承認
に関するブタペスト条約」

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い
発行する。

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL
DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

原寄託についての受託証

氏名 (名称)

寄託者

協和醗酵工業株式会社
取締役社長 松田 謙 殿

あて名

〒100-8185
東京都千代田区大手町一丁目6番1号

I. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

KM2160

(受託番号)

FERM BP-10090

II. 科学的性質及び分類学上の位置

I欄の微生物には、次の事項を記載した文章が添付されていた。

☒ 科学的性質☒ 分類学上の位置

III. 原寄託申請の受託

本国際寄託当局は、平成 16 年 8 月 12 日に受領したI欄の微生物を受託する。

IV. 移管申請の受託

本国際寄託当局は、 年 月 日(国内受託日)に受託したI欄の微生物を受託する。

(年 月 日に寄託されたFERM P- より移管)

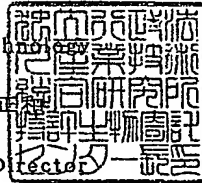
V. 国際寄託当局

独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

名称 International Patent Organism Depositary
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

センター長 山岡 正

Dr. Masakazu Yamaoka, Director



あて名 日本国 茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566)

AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi,
Ibaraki-ken 305-8566 Japan

平成 16 年 (04) 8 月 12 日

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018430

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K39/395, 38/19, 45/00, 31/475, 31/519, 31/675, 31/7048,
A61P35/00, 9/00, C07K16/28, 16/46, 14/535, 14/56, 14/55,
14/54

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K39/395, 38/19, 45/00, 31/475, 31/519, 31/675, 31/7048,
A61P35/00, 9/00, C07K16/28, 16/46, 14/535, 14/56, 14/55,
14/54

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN) , REGISTRY (STN) , MEDLINE (STN) , BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2003/018635 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 06 March, 2003 (06.03.03), Particularly, Claims; examples & US 2003/175273 A1 & EP 1449850 A1	1-26
Y	WO 2001/064754 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 07 September, 2001 (07.09.01), Particularly, Claims; examples & US 2002/098527 A1 & EP 1270595 A1	1-26

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28 February, 2005 (28.02.05)

Date of mailing of the international search report
15 March, 2005 (15.03.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018430

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2002-539079 A (Millenium Pharmaceuticals, Inc.), 19 November, 2002 (19.11.02), Particularly, Claims; examples & WO 2000/042074 A1 & US 6488930 B1 & EP 1144453 A1	1-26
Y	Hitoshi TAKEUCHI, "Seijin ALL no Kagaku Ryoho", Igaku no Ayumi, 31 July, 1999 (31.07.99), Vol.190, No.5, pages 474 to 479	1-23,25,26
Y	Kazunari ONISHI, "CML no Hyojunteki Chiryoho", Igaku no Ayumi, 31 July, 1999 (31.07.99), Vol.190, No.5, pages 481 to 485	1-25
Y	Shuya KUSUMOTO et al., "Kyusei Hakketsubyo Chiryo ni Okeru Cytokine no Tsukaikata", Igaku no Ayumi, 31 July, 1999 (31.07.99), Vol.190, No.5, pages 522 to 529	1-26
Y	WO 2002/010743 A1 (Oso Makuniru Famashuchikaru Inc.), 07 February, 2002 (07.02.02), Particularly, Claims; page 2, lines 14 to 25; page 8, line 10 to page 9, line 27; examples & JP 2004-505114 A & US 2002/0052317 A1 & EP 1325324 A1	1-26
Y	JP 2002-544173 A (Immunomedics, Inc.), 24 December, 2002 (24.12.02), Particularly, Claims; page 30, line 17 to page 31, line 16; page 33, lines 1 to 25 & WO 2000/67795 A1 & US 6306393 B1 & EP 1189926 A1	1-26
Y	WO 2002/012347 A1 (Immunomedics, Inc.), 14 February, 2002 (14.02.02), Particularly, Claims; page 22, lines 6 to 16; page 24, line 26 to page 25, line 14 & JP 2004-505994 A & US 2002/0022031 A1 & EP 1309627 A1	1-26

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ A61K39/395, 38/19, 45/00, 31/475, 31/519, 31/675, 31/7048, A61P35/00, 9/00, C07K16/28, 16/46, 14/535, 14/56, 14/55, 14/54		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ A61K39/395, 38/19, 45/00, 31/475, 31/519, 31/675, 31/7048, A61P35/00, 9/00, C07K16/28, 16/46, 14/535, 14/56, 14/55, 14/54		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 2003/018635 A1 (協和醗酵工業株式会社), 2003. 03. 06, 特に、特許請求の範囲及び実施例 & US 2003/175273 A1 & EP 1449850 A1	1-26
Y	WO 2001/064754 A1 (協和醗酵工業株式会社), 2001. 09. 07, 特に、特許請求の範囲及び実施例 & US 2002/098527 A1 & EP 1270595 A1	1-26
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 28. 02. 2005		国際調査報告の発送日 15. 3. 2005
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 上條 のぶよ 4C 9454 電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2002-539079 A (ミレニアム・ファーマシュー ティカルズ・インコーポレイテッド), 2002. 11. 19, 特 に、特許請求の範囲及び実施例 & WO 2000/04207 4 A1 & US 6488930 B1 & EP 1144 453 A1	1-26
Y	竹内仁, 成人ALLの化学療法, 医学のあゆみ, 1999. 07. 31, Vol. 190, No. 5, p. 474-479	1-23, 25, 26
Y	大西一功, CMLの標準的治療法, 医学のあゆみ, 1999. 0 7. 31, Vol. 190, No. 5, p. 481-485	1-25
Y	楠本修也等, 急性白血病治療におけるサイトカインの使い方, 医学 のあゆみ, 1999. 07. 31, Vol. 190, No. 5, p. 522-529	1-26
Y	WO 2002/010743 A1 (オーソ マクニール・ファ ーマシューチカル・インコーポレーテッド), 2002. 02. 0 7, 特に、特許請求の範囲、第2頁第14-25行, 第8頁第10 行~第9頁第27行, 及び実施例 & JP 2004-5051 14 A & US 2002/0052317 A1 & EP 1325324 A1	1-26
Y	JP 2002-544173 A (イムノメディクス, インコー ポレイテッド), 2002. 12. 24, 特に、特許請求の範囲、 第30頁第17行~第31頁第16行, 第33頁第1行~第25行 & WO 2000/67795 A1 & US 63063 93 B1 & EP 1189926 A1	1-26
Y	WO 2002/012347 A1 (イムノメディクス, インコ ーポレイテッド), 2002. 2. 14, 特に、特許請求の範囲、 第22頁第6~16行, 第24頁第26行~第25頁第14行 & JP 2004-505994 A & US 2002/00 22031 A1 & EP 1309627 A1	1-26